

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-506619

(43) 公表日 平成11年(1999) 6月15日

(51) Int.Cl.<sup>8</sup>

A 2 3 J 1/14

識別記号

F I

A 2 3 J 1/14

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願平9-527197  
 (86) (22) 出願日 平成9年(1997) 1月29日  
 (85) 翻訳文提出日 平成10年(1998) 7月31日  
 (86) 国際出願番号 PCT/CA97/00057  
 (87) 国際公開番号 WO97/27761  
 (87) 国際公開日 平成9年(1997) 8月7日  
 (31) 優先権主張番号 08/594, 909  
 (32) 優先日 1996年1月31日  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 ビー. エム. ダブリュ. カノラ インク.  
 カナダ国 アール3エヌ 0ティー9 マ  
 ニトバ州 ウィニペグ ナイアガラ ス  
 トリート 64  
 (72) 発明者 マリー, エドワード ディー.  
 カナダ国 エヌ0ビー 1ビー0 オンタ  
 リオ州 エデン ミルズ ローリー レイ  
 ン 19  
 (74) 代理人 弁理士 若林 忠 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脂肪種子タンパク質の抽出法

(57) 【要約】

脂肪含有量の極めて高い脂肪種子ミール、特にカノラ種子ミールを食品級塩類溶液で抽出し、脂肪種子ミール中のタンパク質および脂肪を溶解させてタンパク質水溶液を形成することによって、タンパク質濃度が高く且つ脂肪残留濃度の低いタンパク質単離物を本質的に未変性の状態で得る。このタンパク質水溶液を冷却し、遠心分離することによって脂肪を除去する。イオン強度を本質的に一定に保ちながら、この脱脂タンパク質溶液中のタンパク質濃度を高める。さらに脂肪除去操作を濃縮タンパク質溶液に行ってもよい。この濃縮タンパク質溶液を、約0.2以下のイオン強度に希釈してタンパク質ミセルの形態で水相中に単離タンパク質粒子を形成させる。これらのタンパク質ミセルを沈殿させて、非結晶の粘稠なゼラチン状でグルテン様のタンパク質ミセル塊の形態でタンパク質単離物の凝集塊を形成させる。そして、上清を除去し、乾燥させてタンパク質粉末を得る。

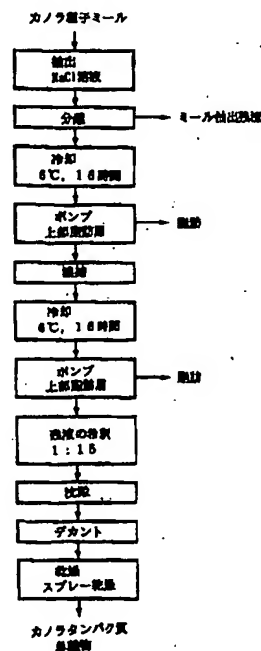


図 1

## 【特許請求の範囲】

1. (a) 脂肪種子ミール中のタンパク質および脂肪を溶解させてタンパク質水溶液を形成するために、ミールの約10重量%以下の脂肪を含む脂肪種子ミールを、イオン強度が少なくとも約0.2、pHが約5～約6.8の食品級塩類水溶液を用いて温度約5～約35℃で抽出する工程、

(b) タンパク質水溶液と脂肪種子ミール抽出残渣とを分離する工程、

(c) 脱脂タンパク質溶液を得るためにタンパク質水溶液から脂肪を除去する工程、

(d) 濃縮脱脂タンパク質溶液を形成するために、イオン強度を本質的に一定に保ちながら脱脂タンパク質溶液のタンパク質濃度を増大させる工程、

(e) 少なくとも部分的にタンパク質ミセルの形態で水相中に分離タンパク質粒子が形成するように、濃縮脱脂タンパク質溶液をイオン強度約0.2以下に希釈する工程、

(f) 少なくとも部分的に非結晶の粘稠なゼラチン状でグルテン様のタンパク質ミセル塊の形態でタンパク質単離物の塊が形成するように、タンパク質ミセルを沈殿させる工程、

(g) タンパク質単離物と上清とを分離する工程、

(h) 本質的に未変性で少なくとも約90重量%のタンパク質を含む乾燥タンパク質粉末が得られるように、分離したタンパク質単離物を乾燥する工程、  
を有するタンパク質単離物の形成方法。

2. 前記の食品級塩類水溶液がイオン強度約0.3～約0.6である請求項1記載の方法。

3. 前記の抽出工程を約10分～約60分間行う請求項1記載の方法。

4. 前記の食品級塩類水溶液がpH約5.3～約6.2である請求項2記載の方法。

5. 前記のタンパク質水溶液は、タンパク質濃度が約10～約100g/lで、溶解脂肪濃度が約1～約10g/lである請求項1記載の方法。

6. タンパク質水溶液を冷却して水相から脂肪を分離させ、次いで水相から脂

肪を除去することにより、タンパク質水溶液から脂肪を除去する請求項5記載の方法。

7. 前記の脂肪をデカント、遠心分離および／又は精密濾過によって除去する請求項6記載の方法。

8. 前記のタンパク質水溶液を約15℃以下の温度まで冷却することによって前記のタンパク質水溶液から約30～約90%の脂肪を除去する請求項6記載の方法。

9. 前記のタンパク質水溶液を約3～約7℃に冷却する請求項6記載の方法。

10. タンパク質水溶液中の脂肪の約70～約90%を除去する請求項9記載の方法。

11. 前記冷却工程を前記脂肪種子ミール抽出残渣の分離前のタンパク質水溶液について行い、水相から脂肪を除去した後に前記抽出残渣をタンパク質水溶液から分離する請求項6記載の方法。

12. タンパク質水溶液と脂肪種子ミール抽出残渣とを分離した後に、前記冷却工程をタンパク質水溶液について行う請求項6記載の方法。

13. 選択的メンブラン法を用いることによって、イオン強度を保持しながら脱脂タンパク質溶液を濃縮する請求項1記載の方法。

14. 脱脂タンパク質溶液を約3.0～約10の濃縮率で濃縮する請求項13記載の方法。

15. 前記の濃縮を約20℃～約45℃の温度で行う請求項14記載の方法。

16. 濃縮脱脂タンパク質溶液を前記希釈工程の前にさらに脂肪除去工程に供する請求項1記載の方法。

17. 前記の2回目以降の脂肪除去工程を濃縮脱脂タンパク質溶液を冷却することにより行って水溶液から脂肪を分離させ、次いで水相から脂肪を除去する請求項16記載の方法。

18. 脂肪をデカント、遠心分離および／又は精密濾過によって除去する請求項17記載の方法。

19. 前記のタンパク質水溶液を約15℃以下の温度まで冷却することによ

て前記のタンパク質水溶液から約30～約90%の脂肪を除去する請求項17記載の方法。

20. 前記の濃縮脱脂タンパク質水溶液を約3～約7℃に冷却する請求項17記載の方法。

21. 濃縮タンパク質水溶液中の脂肪の約70～約90%を除去する請求項20記載の方法。

22. 希釈工程を約25℃以下の温度で行う請求項1記載の方法。

23. 希釈工程は、濃縮タンパク質溶液を温度約3～約15℃の冷水に添加して行う請求項22に記載の方法。

24. 前記の希釈をイオン強度約0.06～約0.12で行う請求項22記載の方法。

25. 前記タンパク質ミセルを遠心分離で沈澱させる請求項24記載の方法。

26. 前記の脂肪種子ミールがカノラ種子ミールである請求項1記載の方法。

27. 前記の脂肪種子ミールがアブラナ種子ミールである請求項1記載の方法。

28. 前記の脂肪種子ミールが大豆種子ミールである請求項1記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 発明の名称

## 脂肪種子タンパク質の抽出法

## 発明の分野

本発明は、脂肪種子(oil seed)及びタンパク質ミール(protein meal)からのタンパク質物質の調製および精製に関する。

## 関連出願

本願は、1996年1月31日に出願の同時継続米国特許出願番号08/549,909号の一部継続(CIP)出願である。

## 発明の背景

今日の商業的な脂肪種子加工技術は、透明な超脱ガム油(superdegummed oil)の製造に注力するもので、その結果として、ガム(gum)、ソーブストック(soapstock)、漂白クレー及び色素を油から除去する。これらは副産物であり、脂肪種子を粉碎し油を除去したミールに添加することによって廃棄される。

このような物質を脂肪種子ミール(oil seed meal)に添加すると、環境条件に敏感な単離技術によっては約90%以上のタンパク質を含む単離物を抽出することは困難となる。従来の加工技術では、通常、市販のミール中に存在する脂肪がタンパク質とともに濃縮される。

従来の加工技術で達成可能なタンパク質のレベルは一般に約70~75%を超えることはなく、食品系中のその機能は脂肪の干渉により妨害される。さらに、乾燥タンパク質製品中に脂肪が存在すると、酸敗、および溶解性の低下、ケーキング(caking)などの脂肪に関連した問題、ならびに脂肪と一緒に抽出されるミール中の色素による変色などが起こる。

脂肪種子植物の育種プログラムの一環として、脂肪種子からの油収率の向上を目的とした努力が行われ、実際に、油収率の高い品種、例えばカノラ(アブラナ)の品種が開発されている。しかしながら、そのような油収率の向上は、油の精製による副産物を脂肪種子ミールに添加する結果、脂肪種子ミール中に存在する脂肪の割合を高める影響がある。

(6)

特表平11-506619

有機溶媒抽出によって脂肪種子ミールからこのような脂肪の少なくとも一部を除去することは可能であるが、有機溶媒を使用するとタンパク質の変性が起こり、特に高温下では顕著である。その結果、製品の機能を損ない、加えて、環境的に問題となる有機溶媒の廃棄および回収が必要となる。

本発明者による米国特許4, 208, 323号では、各種原料からのタンパク質の単離工程が記載されている。当該工程に用いるタンパク質原料としては、脂肪種子などの各種の原料が考えられる。この特許が発行された1980年代に利用できた脂肪種子ミールには、今日の脂肪種子ミールほどの脂肪分が含まれていなかった。したがって、この特許に記載されている方法では、今日の脂肪種子ミールを用いて、製造されるタンパク質物質の特徴である90%以上のタンパク質を含む製品を製造することは困難である。コールドプレスミール(cold-pressed meal)を含む今日の脂肪種子ミールからそのような製品を製造するためには、当該工程を著しく改良する必要がある。

#### 発明の概要

本発明は、今日脂肪含有の脂肪種子ミールからタンパク質含有量の高い精製タンパク質単離物を得ることができる方法を提供することによって、従来の技術の問題点を解決しようとするものである。

本発明は、以下の工程を有するタンパク質単離物の形成方法である。(a) 脂肪種子ミール中のタンパク質物質および一部の脂肪を溶解させてタンパク質溶液を形成するために、ミールの約10重量%以下の脂肪を含む脂肪種子ミールを、イオン強度が少なくとも約0.2、pHが約5~約6.8の食品級塩類溶液を用いて温度約15℃~約75℃で抽出する工程、(b) 工程(c)の前または工程(c)の後にタンパク質溶液と脂肪種子ミール抽出残渣とを分離する工程、(c) 脱脂タンパク質溶液を得るためにタンパク質溶液から脂肪を除去する工程、(d) 濃縮脱脂タンパク質溶液を形成するために、イオン強度を本質的に一定に保ちながら脱脂タンパク質溶液のタンパク質濃度を増大させる工程、(e) 高度に凝集した微細なタンパク質ミセルの形態で水相中に分離タンパク質粒子が形成するよう

に、濃縮脱脂タンパク質溶液をイオン強度約0.2以下まで希釈する工程、(f) 少なくとも部分的に非結晶の粘稠なゼラチン状でグルテン様のタンパク質ミセル塊の形態でタンパク質単離物の塊が形成するように、タンパク質ミセルを沈殿させる工程、(g) タンパク質単離物と上清とを分離する工程、(h) 本質的に未変性で少なくとも約90重量%のタンパク質を含む乾燥タンパク質粉末が得られるように、分離したタンパク質単離物を乾燥する工程。

本発明では、タンパク質ミセルを得るための希釈工程に先だって1回または数回の脂肪除去工程を行う必要がある。さもないと、ミセルの生成工程でタンパク質と脂肪と一緒に分離し、脂肪によるタンパク質の希釈により目的とする純度のタンパク質単離物を得ることはできない。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明の実施例に係わるタンパク質の単離手順を示す模式図である。ここではカノラ種子のミールを用いたが、一般にその他の脂肪種子ミールにも用いることができる。

図2は、本発明の別の実施例に係わるタンパク質の単離手順を示す模式図である。ここではカノラ種子のミールを用いたが、一般にその他の脂肪種子ミールにも用いることができる。

#### 発明の詳細な説明

本発明の方法に含まれる工程を図1及び図2の工程図に示す。

本発明の方法の最初の工程は、脂肪種子ミール、特にカノラ種子ミール(canola meal)を原料としてタンパク質物質を抽出するものであるが、この工程はその他の脂肪種子ミール、例えば大豆のミールおよびアブラナ種子ミールにも適用することができる。当該タンパク質物質はカノラ種子またはその他の脂肪種子中に存在する天然タンパク質であってもよいし、特異的な疎水性及び極性の性質を有するタンパク質であれば遺伝子操作によってもたらされたタンパク質でもよい。カノラ種子ミールは、例えば温ヘキササン抽出または冷間押出法(cold oil extrusion method)でカノラ油が除去された、各種レベルの未変性タンパク質を含むあらゆるカノラ種子

のミールであってもよい。上記のようにこれら脂肪種子ミールは、粉末の約10%またはそれ以下に相当するかなりの脂肪分を含む。

タンパク質の抽出には食品級塩類溶液を用いる。食品級塩類溶液は通常塩化ナトリウムであるが、その他の塩類、例えば塩化カリウムを用いてもよい。かなりの量のタンパク質を抽出するためには、食品級塩類溶液のイオン強度を少なくとも約0.2とする。塩類溶液のイオン強度を増加させると、当初原料中のタンパク質の抽出率が増加するが、やがて最高値に達する。それ以上イオン強度を上げても、タンパク質の総抽出率は増加しない。最高のタンパク質抽出率が得られる食品級塩類溶液のイオン強度は、塩の種類及び選んだタンパク質原料によって異なる。

イオン強度が高くなるとタンパク質の沈殿に要する希釈率が増加するので、イオン強度は通常約0.8以下、望ましくは約0.3~約0.6とする。しかし、5.0までのイオン強度を用いた。図1及び図2に示す実施例では、カノラ種子ミール中のタンパク質の抽出に0.5MのNaClを用いる。

タンパク質の塩抽出は、約5℃~約35℃の温度で、望ましくは抽出時間を短縮するために攪拌しながら通常約10~60分間行う。この抽出は、原料からのタンパク質の抽出率が最高になるような条件で行うことが望ましい。

温度が5℃未満になると抽出時間が長くなり、実用的ではないので温度の下限値は約5℃とする。また温度が35℃を超えると微生物の増殖が急速に増加し、許容限界を越えるので、温度の上限は約35℃とする。

タンパク質単離物をミセル経由で形成させるためには、以下に詳細を述べるように食品級塩類溶液および脂肪種子ミールは、約5~6.8の自然pHを有する必要がある。タンパク質単離物の収率を最高にするための最適pHは、選んだタンパク質原料によって異なる。

pH範囲の限界またはその付近ではミセル経由によるタンパク質の沈殿が部分的にしか起こらず、pH範囲の他の点と比較して収率が低い。そのため、pH約5.3~6.2が望ましい。

食品級塩類溶液のpHは、抽出工程で必要に応じて好ましい食品級の酸、通常



塩酸または食品級のアルカリ、通常水酸化ナトリウムを用いてpH約5～約6、8の範囲内の好ましい値に調整してもよい。

抽出工程における食品級塩類溶液中のタンパク質原料の濃度は、広い範囲にあってもよい。典型的な濃度は、約5～約15重量/容量%である。

塩類溶液を用いたタンパク質抽出工程はカノラ種子ミール中のある種の脂肪も抽出する効果もあり、そのために水相中に脂肪が存在することになる。

タンパク質溶液は一般に約10～約100g/l、好ましくは約30～約70g/lのタンパク質と、約1～10g/lの溶解脂肪を含む。タンパク質溶液の一部を採り、標準全脂肪検定法(standard total fattesting method)で脂肪濃度を測定することもできる。

次に、適当な方法で、例えばブレードプレス(bladder press)、続いて遠心分離等を用いて、図1に示すように、抽出工程で得られた全ての水相とカノラ種子ミール残渣とを分離する。分離した抽出残渣は乾燥後、廃棄する。別の方法としては、図2の実施例で示すように、下記の最初の脂肪除去工程後に抽出残渣を分離してもよい。

次に、タンパク質溶液を脱脂操作に供し、脂肪の少なくとも一部を除去する。脱脂操作は、タンパク質の水溶液を攪拌することなく約15℃以下の温度、好ましくは約10℃、特に約3℃～約7℃の範囲にまで冷却し、デカント、遠心分離および/または例えば5μmのGAFバッグフィルターを用いた限外濾過等の精密濾過操作で水相と脂肪を分離する。冷却したタンパク質溶液の一部を採り、冷却により除去する脂肪を測定してもよい。図1に示した実施例では、例えばポンプ等を用いて溶液の表面から脂肪をデカントし、残った脂肪の沈殿を精密濾過によって除去する。別の方法としては、図2の実施例に示すように、冷却工程後に脱脂タンパク質溶液の遠心分離を行い、ミールの抽出残渣を分離してもよい。

一般に脱脂操作はタンパク質溶液中の脂肪を約30～約90%、好ましくは約70～約90%除去するように行い、脱脂タンパク質溶液をさらに

処理したとき、高濃度のタンパク質単離物が得られるようにする。

次に、脱脂タンパク質溶液を濃縮し、タンパク質濃度を上げる一方で、イオン

強度を本質的に一定に保つ。

濃縮工程は、限外濾過または透析濾過等の選択的メンブラン濾過法を用いて行うことができる。この濃縮工程は工程全体で得られるタンパク質ミセル単離物の収率を高くする効果があり、したがって工程全体のタンパク質単離効率が高くなる。

タンパク質溶液の濃縮の程度は、「濃縮率」と呼ぶ。濃縮率は濃縮後の溶液量に対する濃縮前の溶液量の比で表されることから、タンパク質の濃度は1.0から増大し、可能収率は最高収率に達するまで増加する。

最高可能収率に達すると、それ以上濃縮を行ってもその後のタンパク質単離工程での希釈に要する溶液の量に関して利点があるに過ぎない。

最高可能収率に達するときの濃縮率は、用いるタンパク質原料の種類およびタンパク質溶液のpHによって異なる。濃縮率は、よく最高可能収率が得られる約3.0～約10とするのが望ましい。通常、濃縮係数は少なくとも約1.1とする。濃縮率は高すぎるとタンパク質溶液の粘性が高くなり、その後の処理が困難となるので、高い値の使用は避ける。

濃縮は適当な温度、典型的には約20℃～約45℃で、所定の濃度が得られるまでの時間行う。温度及びその他の条件は濃縮に用いるメンブラン装置および溶液中のタンパク質濃度によってある程度異なる。

この工程におけるタンパク質溶液の濃縮は、工程全体での収率を上げるのみならず、乾燥後の最終タンパク質単離物中の塩類濃度を減少させる効果がある。塩類濃度の変動は特定の用途の食品に用いた場合の機能および味覚に影響するため、単離物中の塩類濃度を調整することは単離物の適用において重要である。

よく知られているように限外濾過および同様な選択的メンブラン技術では分子量の小さい物質が膜を透過し、分子量の大きい物質は膜を透過しない。分子量の小さい物質にはイオン性物質のみならず、炭水化物、色素等の原料から抽出された低分子量の物質も含まれる。膜の分子量カットオフ

は、通常溶液中のタンパク質が本質的に全て保持されるように選ぶ。

濃縮工程で抽出液から低分子量の物質を除去すると、抽出工程でタンパク質が

沈殿することなく、タンパク質濃度を達成可能な最高濃度以上に増大させることができる。

濃縮したタンパク質溶液はさらに脂肪除去工程に供する。すなわち、濃縮したタンパク質溶液を約15℃、望ましくは約10℃以下、特に約3℃～約7℃の範囲内に冷却して水相から脂肪を分離させ、濃縮タンパク質溶液から脂肪を除去する。すでに最初の脂肪除去工程で述べた方法を単独または組み合わせて用い、冷却した濃縮タンパク質溶液から脂肪を除去してもよい。この脱脂操作で一般に残留脂肪の約30～約90%、好ましくは約70～約90%を除去し、濃縮タンパク質溶液中の残留脂肪濃度を約1～約10 g/lとする。

タンパク質溶液の一部を採って、冷却で除去すべき脂肪の量を測定してもよい。ポンプ等を用いて溶液の表面から脂肪をデカントし、脱脂溶液を精密濾過に供し、脂肪の沈殿を除去する。

初期タンパク質濃度および用いた濃縮率によって異なるが、一般に約40～約200 g/lのタンパク質濃度を有する濃縮および脱脂工程で得られた濃縮タンパク質溶液を、必要なイオン強度にまで下げるのに必要な量の水に添加し、イオン強度を約0.2以下に希釈する。

タンパク質単離物の収率は低温で高くなるので、濃縮タンパク質溶液を添加する水の温度は一般に約25℃以下、好ましくは約3℃～約15℃とする。

イオン強度が低いと、ミセル状の分離タンパク質小滴中に高度に凝集したタンパク質分子の雲状の集合体を形成する。タンパク質ミセルを放置して沈殿させ、凝集し、凝結した高密度の非結晶の粘稠なグルテン様タンパク質単離物を形成させる。遠心分離等によって、沈殿を集めてもよい。このような強制沈殿はタンパク質単離物中の液体を減少させ、総単離物中の水分を一般に約70～約95重量%から約50～約80重量%減少させる。このようにして単離物中の水分を減少させると、単離物に保持されている

塩類濃度も減少する。それ故、乾燥単離物中の塩類濃度も減少する。

濃縮タンパク質溶液中のイオン強度を約0.2以下に希釈するとミセル化効率に影響があり、したがって得られる単離物の収率にも影響がある。そのため、イ

オン強度は通常約0.15以下、好ましくは0.1以下に下げる。本発明でイオン強度約0.1～約0.2でタンパク質単離物の良好な収率が得られることは上記従来技術とかなり異なり、従来技術では良好な収率を得るためにはイオン強度を0.1以下に下げる必要があった。

希釈は、収率が最高となる約0.06～約0.12の範囲のイオン強度になるように行う。イオン強度が約0.06未満になるように希釈してもそれ以上の利点はない。希釈タンパク質溶液のイオン強度の下限は、工程の操作性よりも溶液量の経済性の面を考慮して決定する。図示した実施例では、濃縮タンパク質溶液と水の比が約1:15になるように希釈した。

上清をデカントするなどして、非結晶の凝集、粘稠、ゼラチン状、グルテン様タンパク質塊として沈殿させた単離物（以下「タンパク質ミセル塊」または「PMM」という。）を分離する。PMMは湿ったまま、または噴霧乾燥、凍結乾燥または真空ドラム乾燥等の従来の技術で乾燥させて使用する。乾燥PMMは、通常タンパク質として約90%以上の高タンパク質含有量（ケールダール法で測定したN量 $\times 6.25$ ）を有し、本質的に未変性（示差走査熱量法で測定）である。脂肪種子ミールから単離した乾燥PMMは、脂肪含有量も低く、約1%以下である。

高レベルの未変性タンパク質が得られることは、従来の技術で得られるタンパク質レベルときわめて対照的である。今日得られる脂肪種子ミールを用いた本発明の方法で得られるきわめて高い未変性タンパク質含有量は、米国特許4,208,323号でその特許に記載されているタンパク質原料を用いて得られたものと同等である。

本発明にしたがって上記のように特異的な脱脂操作を行うことによって、脂肪を含む脂肪種子ミールを用いた未変性方法で高いタンパク質レベルを達成することができる。本発明の手順は改良タンパク質ミセル塊の液体除去製品（以下「PMML E」という。）を提供することが可能である。

以下の実施例によって本発明をさらに詳細に説明する。

#### 実施例 1

本実施例では、図1を参照しながら本発明の一実施形態に従ってカノラ種子ミールからのタンパク質単離物の調製を説明する。

市販のカノラ種子ミール(50kg)を、600L容システム中の水道水を用いた500Lの塩化ナトリウム水溶液(0.5M)に添加した。

パドル型のミキサーを用い、混合物を8℃、76.0rpmで4時間攪拌した。次いで、ウイルメス型ブレードプレス(Wilmes type bladder press)を用い、混合物全体を圧縮工程に供した。圧縮から回収した液体をウエストファリア遠心分離器(Westphalia clarifier)で遠心分離し、13mg/mlのタンパク質を含む粗タンパク質抽出液477Lを得た。

次に、粗タンパク質抽出液を6℃で16時間冷却し、溶液の表面に脂肪層を形成させた。この上層をポンプで除去し、残ったタンパク質溶液を孔径5µmのバグ型フィルター(bag-type filter)で濾過し、溶液中の外皮および細胞膜の破片ならびに脂肪の残留粒子を除去した。

分子量カットオフ30,000のホローファイバー限外濾過装置(hollow fiber ultrafiltration)を用いて透明な溶液を濃縮し、タンパク質濃度約120mg/mlの溶液50Lを得た。得られた50Lの濃縮液を6℃で16時間再度冷却して溶液の表面に薄い脂肪の膜を形成させ、この膜をすくい取り、廃棄した。

高タンパク質抽出液を、水道水(6℃)で15倍に希釈した。希釈すると、直ちに白色の混濁が認められた。攪拌することなく、このタンパク質混濁物(カノラ種子ミール中のタンパク質は疎水性であるため、タンパク質が凝集したことによる)を放置し、希釈容器中で沈澱させた。ポンプで希釈水の上層を除去し、沈澱した粘稠なタンパク質塊を集めてスプレー乾燥した。得られたタンパク質単離物(溶液中のタンパク質含有量91%)は、示差走査熱量測定法で各種食品への応用に適した高度の機能性を有する天然のままのタンパク質であることが確認された。単離物中の最終脂肪濃度は0.93%であった。

## 実施例2

本実施例では、図2を参照しながら本発明の一実施形態に従ってアブラナ種子の溶媒抽出されたミールからのタンパク質単離物の調製法を説明する

タンパク質32.5% (試料中濃度)、脂肪10.1%及び水分6.1%を含む市販のポーランド種アブラナ種子ミールを、塩類1.46重量%を含む水を用いて10重量/容量%の比で抽出した。抽出系を25℃で2時間攪拌し、実施例1と同様に処理してミールの抽出残渣を除去し、次いで8℃に冷却し、1時間放置して沈澱させた。この沈澱工程後に、沈澱系の上層から約200gの脂肪を除去し、次いで水相を遠心分離して粒状物質を除去した。上清を透析濾過し、続いて分子量カットオフ値30,000ダルトン(daltons)の膜を用いて濃縮した。この併合膜濃縮工程は4.5時間を要し、総固形物含有量4.1% (乾重量あたりタンパク質濃度43.9%) のタンパク質抽出物が得られた。冷却した水道水(2℃)でタンパク質抽出物を15倍に希釈すると、直ちに凝集したタンパク質の白色ミセルの混濁が生成した。このミセル塊を3℃で14時間放置して沈澱を形成させ、上層の希釈水をデカントし、沈澱した粘稠なタンパク質塊を集め、乾燥し、最終タンパク質製品を得た。

#### 実施例3

本実施例では、カノラ種子の冷間圧縮 (押し出し) ミールを用いた場合を説明する。

未変成のカノラ種子を冷間押し出しプレス (モンフォート型) にそのまま供給し、圧縮粉碎し、得られたプラグを破碎し、圧縮された種子の破片 (油の抽出かす) を標準的なミル (フィツ型) で粉碎し、市販のカノラ種子ミールと全く同様なミールを得た。これを原料とし、実施例2と同様にタンパク質の抽出および回収工程に供した。希釈してタンパク質ミセルの典型的な混濁物を形成させ、粘稠なミセル塊を集め、乾燥し、最終タンパク質製品を得た。

#### 実施例4

本実施例では、市販の大豆ミールを用いた本発明の手順を説明する。

有機溶媒が使用されない冷間破碎施設から得られた、タンパク質46%を含む市販の大豆ミール (10kg) を、pH6.5の0.35M塩化ナトリウム溶液で30分間攪拌抽出した。原料の脂肪含有量は6.0%であった。この大豆ミールも、水相からの脂肪の除去工程 (ただし、希釈率は1:3.5とした。) を含

む実施例2で述べた図2の手順で処理した。高タンパク質単離物を冷却水道水で希釈すると、直ちに白色のタンパク質混濁物が生成した。タンパク質ミセルを遠心分離で沈殿させ、希釈容器の底に沈殿した粘性の高いタンパク質塊を集め、乾燥し、最終タンパク質製品を得た。

#### 開示の要約

この開示を要約すると、本発明は、温和な非変性工程で脂肪を含む脂肪種子ミールから本質的に脂肪を除去したタンパク質含有量の高いタンパク質単離物を得る新規な方法を提供するものである。本発明の範囲内で改良が可能である。

【図1】

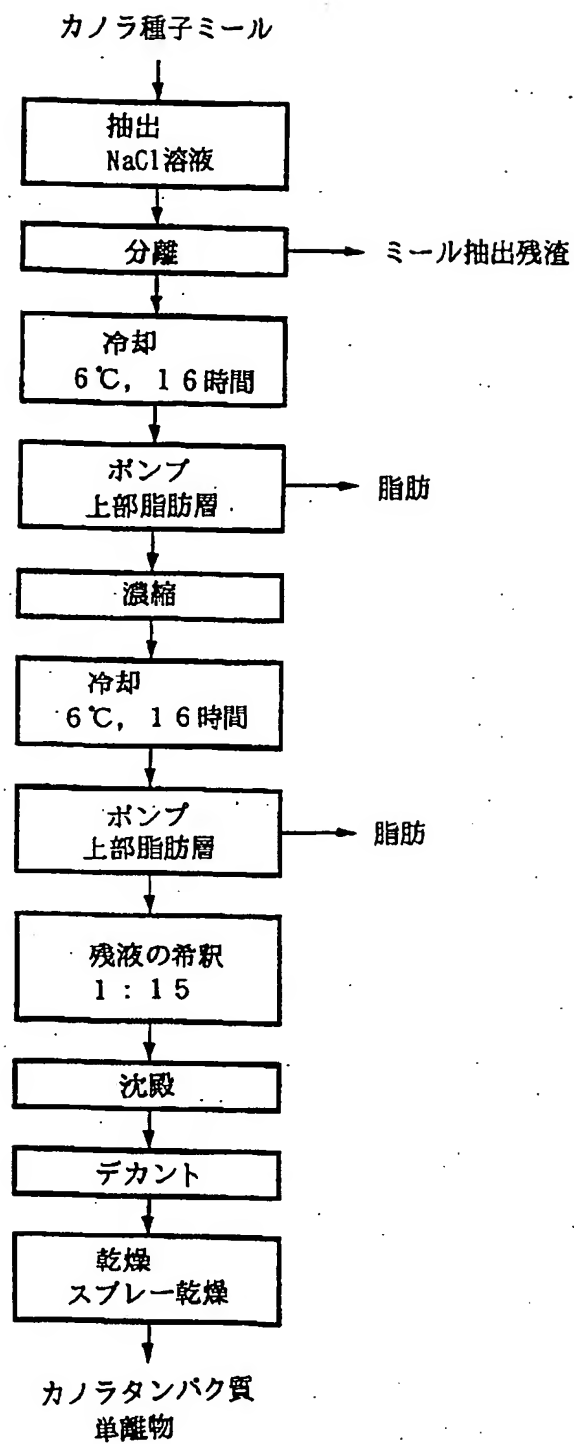


図1



【図2】

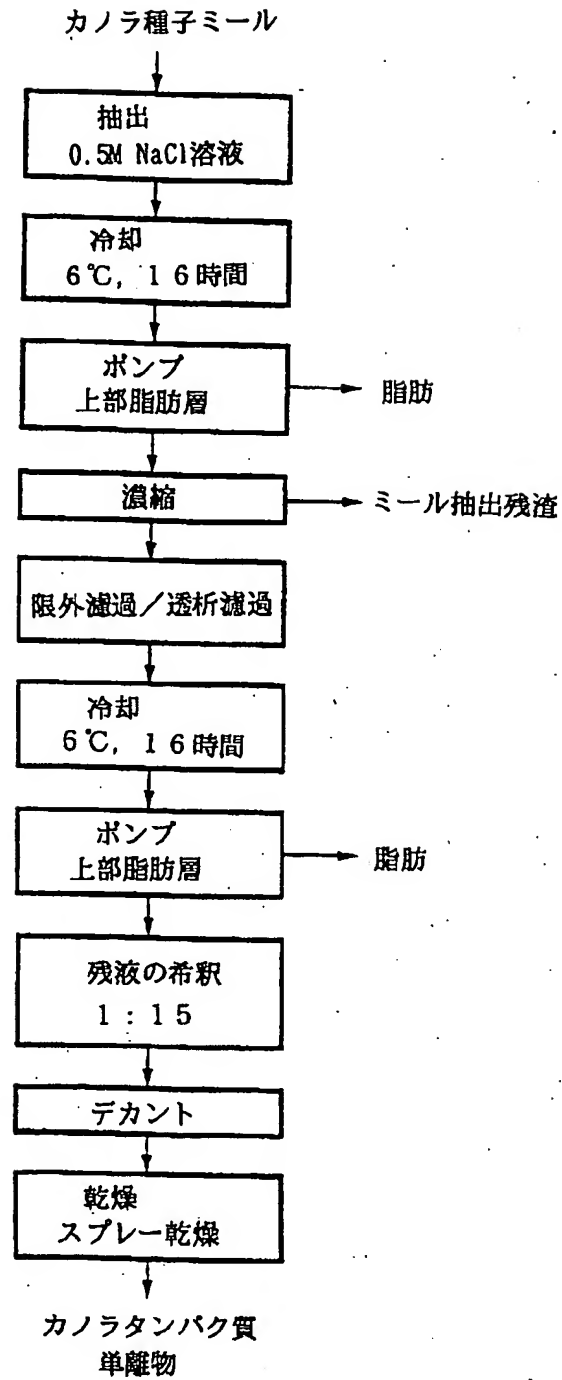


図2

【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】1998年2月23日

【補正内容】

本発明者による米国特許4,285,862号では、均一な両親媒性タンパク質成分からなり、少なくとも1種類の植物性タンパク質原料から形成されたタンパク質ミセルの水懸濁液から固相を沈澱させることにより得られる、非結晶のタンパク質塊の形態を有し少なくとも約90重量%のタンパク質を含み本質的に未変性のタンパク質単離物製品の調製および精製が記載されている。本製品（以下「タンパク質ミセル塊」または「PMM」という。）は、本質的に液体を含まず、本質的に溶解性アラニン(lysinoalanine)を含まず、本質的に原料中の貯蔵タンパク質と同じ濃度のリジンを含む。本発明では、この従来の技術を改良し、脂肪含有量の極めて高い脂肪種子ミールから当該物質を製造する。

【手続補正書】

【提出日】1998年8月4日

【補正内容】

#### 請求の範囲

1. (a) 脂肪種子ミール中のタンパク質および脂肪を溶解させてタンパク質水溶液を形成するために、ミールの10重量%以下の脂肪を含む脂肪種子ミールを、イオン強度が少なくとも0.2、pHが5～6.8の食品級塩類水溶液を用いて温度5～35℃で抽出する工程、

(b) タンパク質水溶液と脂肪種子ミール抽出残渣とを分離する工程、

(c) 脱脂タンパク質溶液を得るためにタンパク質水溶液から脂肪を除去する工程、

(d) 濃縮脱脂タンパク質溶液を形成するために、イオン強度を本質的に一定に保ちながら脱脂タンパク質溶液のタンパク質濃度を増大させる工程、

(e) 少なくとも部分的にタンパク質ミセルの形態で水相中に分離タンパク質粒子が形成するように、濃縮脱脂タンパク質溶液をイオン強度0.2以下に希釈する工程、

(f) 少なくとも部分的に非結晶の粘稠なゼラチン状でグルテン様のタンパク質ミセル塊の形態でタンパク質単離物の塊が形成するように、タンパク質ミセルを沈殿させる工程、

(g) タンパク質単離物と上清とを分離する工程、

(h) 本質的に未変性で少なくとも90重量%のタンパク質を含む乾燥タンパク質粉末が得られるように、分離したタンパク質単離物を乾燥する工程、  
を有することを特徴とするタンパク質単離物の形成方法。

2. 前記の食品級塩類水溶液がイオン強度0.3～0.6であることを特徴とする請求項1記載の方法。

3. 前記の抽出工程を10分～60分間行うことを特徴とする請求項1又は2記載の方法。

4. 前記の食品級塩類水溶液がpH5.3～6.2であることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

5. 前記のタンパク質水溶液は、タンパク質濃度が10～100 g/l

で、溶解脂肪濃度が1～10 g/lであることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

6. タンパク質水溶液を冷却して水相から脂肪を分離させ、次いで水相から脂肪を除去することにより、タンパク質水溶液から脂肪を除去することを特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

7. 前記の脂肪をデカント、遠心分離および／又は精密濾過によって除去することを特徴とする請求項6記載の方法。

8. 前記のタンパク質水溶液を15℃以下の温度まで冷却することによって前記のタンパク質水溶液から30～90%の脂肪を除去することを特徴とする請求項6又は7記載の方法。

9. 前記のタンパク質水溶液を3～7℃に冷却することを特徴とする請求項6～8のいずれか1項に記載の方法。

10. 前記冷却工程を前記脂肪種子ミール抽出残渣の分離前のタンパク質水溶液について行い、水相から脂肪を除去した後に前記抽出残渣をタンパク質水溶液

から分離することを特徴とする請求項6～9のいずれか1項に記載の方法。

11. タンパク質水溶液と脂肪種子ミール抽出残渣とを分離した後に、前記冷却工程をタンパク質水溶液について行うことを特徴とする請求項6～9のいずれか1項に記載の方法。

12. タンパク質水溶液中の脂肪の70～90%を除去することを特徴とする請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

13. 選択的メンブラン法を用いることによって、イオン強度を保持しながら脱脂タンパク質溶液を濃縮することを特徴とする請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

14. 脱脂タンパク質溶液を3.0～10の濃縮率で濃縮することを特徴とする請求項13記載の方法。

15. 前記の濃縮を20℃～45℃の温度で行うことを特徴とする請求項13又は14記載の方法。

16. 濃縮脱脂タンパク質溶液を前記希釈工程の前にさらに脂肪除去工

程に供することを特徴とする請求項1～15のいずれか1項に記載の方法。

17. 前記の2回目以降の脂肪除去工程を濃縮脱脂タンパク質溶液を冷却することにより行って水溶液から脂肪を分離させ、次いで水相から脂肪を除去することを特徴とする請求項16記載の方法。

18. 脂肪をデカント、遠心分離および／又は精密濾過によって除去することを特徴とする請求項17記載の方法。

19. 前記のタンパク質水溶液を15℃以下の温度まで冷却することによって前記のタンパク質水溶液から30～90%の脂肪を除去することを特徴とする請求項17又は18記載の方法。

20. 前記の濃縮脱脂タンパク質水溶液を3～7℃に冷却することを特徴とする請求項17～19のいずれか1項に記載の方法。

21. 濃縮タンパク質水溶液中の脂肪の70～90%を除去することを特徴とする請求項17～20のいずれか1項に記載の方法。

22. 希釈工程を25℃以下の温度で行うことを特徴とする請求項1～21の

いずれか1項に記載の方法。

23. 希釈工程は、濃縮タンパク質溶液を温度3～15℃の冷水に添加して行うことを特徴とする請求項22に記載の方法。

24. 前記の希釈をイオン強度0.06～0.12で行うことを特徴とする請求項22又は23記載の方法。

25. 前記タンパク質ミセルを遠心分離で沈殿させることを特徴とする請求項1～24のいずれか1項に記載の方法。

26. 前記の脂肪種子ミールがカノラ種子ミール、アブラナ種子ミール又は大豆種子ミールであることを特徴とする請求項1～25のいずれか1項に記載の方法。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In Serial Application No.  
PCT/CA 97/00957

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 A23J1/14 A23J1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 A23J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 285 862 A (MURRAY E DONALD ET AL) 25 August 1981 see the whole document ---	1-28
A	US 4 208 323 A (BARKER LARRY D ET AL) 17 June 1980 cited in the application see claims 1-13 see column 2, line 6-16 ---	1-28
A	US 4 366 097 A (CAMERON JACQUELYN J ET AL) 28 December 1982 see claims 1-7 see column 1, line 39-40 ---	1-28
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*T\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*A\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 April 1997

Date of mailing of the international search report

25.04.97

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.O. 5118 Patentan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2940, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

De Jong, E

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.

PCT/CA 97/08057

## C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 289 183 A (UNIV TORONTO) 2 November 1988 see claims 1-5 see page 5, line 6-22 ---	1-28
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 8031 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class 013, AN 80-54624C XP002029269 & JP 55 025 815 B (TAKARA SHUZO CO LTD) , 9 July 1980 see abstract -----	1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/CA 97/00057

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4285862 A	25-08-81	CA 1028552 A	28-03-78
		AU 510365 B	19-06-80
		AU 2851377 A	08-03-79
		DE 2742129 A	06-04-78
		FR 2397158 A	09-02-79
		GB 1532610 A	15-11-78
		JP 1092854 C	16-04-82
		JP 53044654 A	21-04-78
		JP 56031095 B	18-07-81
		NL 7710647 A	03-04-78
		SE 7800041 A	06-08-79
		US 4169090 A	25-09-79
US 4208323 A	17-06-80	CA 1099576 A	21-04-81
		CA 1105309 A	21-07-81
		US 4247573 A	27-01-81
US 4366097 A	28-12-82	US 4418013 A	29-11-83
EP 0289183 A	02-11-88	US 4889921 A	26-12-89
		CA 1311877 A	22-12-92
		DE 3859183 A	23-04-92
		JP 1027433 A	30-01-89



---

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L  
U, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF  
, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, S  
Z, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD  
, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ  
, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ,  
DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, I  
L, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK  
, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, R  
U, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR  
, TT, UA, UG, US, UZ, VN